

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang menggunakan metode *Post Test Only Control Group Design*.

#### 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 14 hari di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari.

#### 4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tikus putih jantan (*Ratus novergicus strain wistar*).

##### 4.3.2 Sampel

Tikus Putih (*Ratus novergicus strain wistar*) jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

##### 4.3.3 Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yang dilakukan dalam penelitian adalah dengan *simple random sampling*.

##### 4.3.4 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan dengan rumus Federer (1999). Yaitu :  
 $(n-1)(t-1) \geq 15$ . Dengan  $n$  = besar sampel, dan  $t$  = banyaknya variabel perlakuan. Maka banyak sampel yang dibutuhkan

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1) - 4 \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 5$$

jika dimasukkan ke dalam rumus *Resorurce Equation*, maka:

$$\sum \text{hewan} = n \times \sum \text{kelompok perlakuan}$$

$$= 5 \times 5 = 25$$

$$\sum (\text{besar sampel}) = \sum \text{hewan} - \sum \text{kelompok perlakuan}$$

$$= 25 - 5$$

$$= 20$$

$$\text{Cadangan} = \frac{n}{1-f}$$

$$= \frac{5}{1-0,2}$$

$$= \frac{5}{0,8}$$

$$= 6,25$$

$$= \sim 7 : 5$$

$$= \sim 2$$

Jadi masing-masing kelompok memiliki 2 ekor tikus cadangan.

Setelah dimasukkan rumus Federer dan dilanjutkan dengan rumus *Resource Equation Methode* didapat 25 ekor tikus yang dibutuhkan untuk penelitian. Ditambah dengan cadangan sebanyak 20% ( $f = 0,2$ ) dari total sampel sehingga didapat 10 ekor tikus cadangan yang masing-masing kelompok terdiri dari 2 ekor tikus cadangan. Jadi, total sampel tikus yang dibutuhkan beserta cadangan adalah 35 ekor tikus dibagi kedalam 5 kelompok. Diketahui kelompok perlakuan sebagai berikut:

- a. Kelompok 1 : Kontrol negatif (diberikan pakan standar berupa BR-1 tanpa induksi  $\text{CCl}_4$ )
- b. Kelompok 2 : Kontrol positif (induksi  $\text{CCl}_4$  0,8ml/kgBB)
- c. Kelompok 3 : (induksi  $\text{CCl}_4$  0,8ml/kgBB + diberi ekstrak methanol kulit kentang dengan dosis 200 mg/200grBB/hari selama 7 hari)
- d. Kelompok 4 : (induksi  $\text{CCl}_4$  0,8ml/kgBB + diberi ekstrak methanol kulit kentang dengan dosis 400 mg/200grBB/hari selama 7 hari)
- e. Kelompok 5 : (induksi  $\text{CCl}_4$  0,8ml/kgBB + diberi ekstrak methanol kulit kentang dengan dosis 800mg/200grBB/hari selama 7 hari)

#### **4.4 Karakteristik Sampel Penelitian**

##### **4.4.1 Kriteria Inklusi**

- a. Tikus berkelamin jantan
- b. Umur tikus 2-3 bulan
- c. Berat badan tikus 150 – 250 gram
- d. Kondisi tikus sehat dengan ditandai aktivitas fisik yang aktif, mata jernih dan bulu bersih.

#### 4.4.2 Kriteria eksklusi

1. Tikus yang sebelumnya pernah dilakukan untuk penelitian lain

#### 4.4.3 Kriteria Drop Out

1. Tikus sakit saat perlakuan
2. Tikus mati saat perlakuan

### 4.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 4.5.1 Variabel

##### a) Variabel bebas

Ekstrak kulit kentang (*Solanum tuberosum l*) dalam tiga dosis yang sudah ditentukan yang diberikan kepada tikus putih jantan (*Rattus novergicus strain wistar*) yang sudah memenuhi kriteria inklusi.

##### b) Variable terikat

MDA hepar tikus putih jantan (*Rattus novergicus strain wistar*) model steatosis.

#### 4.5.2 Definisi Operasional

1. Ekstrak kulit kentang adalah ekstrak yang dibuat menggunakan pelarut methanol 100%. Tanaman kentang diambil dan dibuat ekstraknya di UPT Materia Medika Kota Batu. Dosis yang digunakan diberikan secara peroral menggunakan sonde selama 7 hari dan terbagi atas 3 dosis, yaitu 200mg/200grBB/hari, 400mg/200grBB/hari dan 800mg/200grBB/hari. Skala ukur ekstrak kulit kentang menggunakan ordinal.
2. Kadar MDA diukur oleh laboran Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang pada hari ke ke 15 setelah perlakuan. Pengamatan dilakukan dengan membandingkan kadar MDA antar kelompok perlakuan coba dengan kelompok negative. Kadar MDA diukur dengan metode TBARS menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 532 nm. Skala ukur kadar MDA menggunakan rasio.
3. CCl<sub>4</sub> didapatkan dari Toko Kimia Edu Media. Dosis yang digunakan adalah 0,8ml/kgBB selama 7 hari secara intraperitoneal (Ma'at, 2012).

#### 4.6 Alat dan Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Bahan

- a. Ekstrak kulit kentang
- b. CCl<sub>4</sub>
- c. reagen asam tiobarbiturat 0,8%
- d. KCl 1,15%
- e. sodium dodesil sulfat 8,1%
- f. asam asetat 20%
- g. NaOH

- h. butanol:piridin (15:1 v/v)
- TEP (1,1,3,3-tetraetoksipropan)

#### 4.6.2 Instrumen

##### A. Alat Pemeliharaan Tikus

1. Kandang tikus
2. Penutup kandang tikus dari anyaman kawat
3. Timbangan
4. Botol air
5. Tempat makan tikus

##### B. Alat Untuk Membedah Tikus

1. Pinset
2. Gunting
3. Botol sediaan
4. *Handscoon*

##### C. Pengukuran MDA

- a. 0,5 cc serum ditambah dengan TCA 2.5 volume, HCL uL,  
Aquades 0,5 cc, Na-tiobarbiturat 100uL
- b. Panaskan 100°C selama 25 menit
- c. Sentrifuge 3000rpm
- d. Ambil 3cc supernatant
- e. Baca dengan spektrofotometro dengan panjang gelombang  
352 nm

##### D. Alat lain

1. *Teflon Potter-Elvehjem homogenizer*

2. Sentrifuge
3. spektrofotometer visibel
4. Sonde
5. Kamera
6. Neraca berat badan
7. Label
8. Spuit injeksi 3 ml
9. Gelas objek

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Persiapan Hewan Coba

- a) Awal percobaan dilakukan penimbangan berat badan pada semua tikus kemudian dilakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama dalam mendapatkan perlakuan.
- b) Tikus diadaptasikan selama 7 hari sebelum perlakuan pada kondisi laboratorium. Selama itu tikus diberi pakan tikus standar berupa BR-1 beserta minum tanpa diinduksi apapun termasuk  $\text{CCl}_4$ .
- c) Pada masa adaptasi, berat badan tikus ditimbang yaitu pada saat awal dan akhir adaptasi, agar dapat dipantau bahwa tikus tidak mengalami penurunan berat badan serta berada dalam kondisi yang baik.

##### 4.7.2 Induksi $\text{CCl}_4$

Karbon tetraklorida dilarutkan dengan minyak zaitun dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya disuntikkan secara intraperitoneal selama 7 hari dengan dosis 0,8ml/kgBB (Ma'at, 2012)

#### 4.7.3 Penentuan Dosis Ekstrak Kulit kentang

Penentuan dosis dilakukan pada penelitian sebelumnya dari El-baky dan Ahmed (2011). Pada penelitian tersebut ekstrak methanol kulit kentang hanya menggunakan 1 dosis yakni 2g/kgBB/hari atau setara dengan 400mg/200grBB/hari. Pada dosis tersebut terjadi perbaikan sel hepatosit yang diinduksi CCl<sub>4</sub>. Jika digunakan dosis bertingkat 1/2n, n, 2n didapatkan

Dosis 1 : 200 mg/200grBB/hari.

Dosis 2 : 400 mg/200grBB/hari.

Dosis 3 : 800 mg/200grBB/hari.

#### 4.7.4 Pembuatan Ekstrak Methanol Kulit kentang

##### a) Pengumpulan bahan uji

Bahan uji yang digunakan adalah kulit kentang (*Solanum tuberosum* L). Pemilihan kulit kentang yang digunakan adalah kulit buah yang masih segar, warna kulit kuning kecokelatan dan kulit buah tidak membusuk. Kulit kentang diperoleh dari Materia Medika dalam bentuk ekstrak.

##### b) Pembuatan serbuk kulit kentang

Kulit kentang (*Solanum tuberosum* L) dicuci bersih dibawah air mengalir. Setelah bersih kulit dipotong kecil-kecil dan diangin-anginkan hingga kulit tidak tampak basah kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 24 jam . Setelah kering kulit dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

##### c) Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 1,55 kg serbuk kulit kentang (*Solanum tuberosum* L) dibasahi dengan pelarut methanol sebanyak 1



L. Serbuk yang telah dibasahi dimasukkan ke dalam toples, diratakan dan sambal ditambahkan pelarut methanol sampai terendam. Pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat atau lebih. Pelarut yang ditambahkan sebanyak 4 L. tutup toples dengan rapat selama 48 jam. Kemudian di putar dengan *shaker* digital kecepatan 50 rpm. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tamping ekstrak dengan Erlenmeyer. Ampas dimasukkan lagi dalam toples dan ditambahkan pelarut sampai terendam (minimal pelarut 5 cm diatas permukaan) dibiarkan selama 48 jam diatas *shaker* digital kecepatan 50 rpm. Remaserasi dilakukan sampai filtrat lebih jernih, dalam hal ini menggunakan 3 L pelarut selama 24 jam di atas *shaker* digital kecepatan 50 rpm. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* selama 10 jam. Ekstrak yang dihasilkan kemudian diuapkan kembali diatas *water bath* selama 2 jam.

d) Proses Anastesi, Pembedahan, dan Penguburan Hewan Coba

Proses Anastesi dilakukan satu persatu pada hewan coba dengan cara memasukkan hewan coba kedalam toples kaca yang berisi kapas yang telah dicampur kloroform. Selanjutnya dilakukan anastesi secara inhalasi dengan dosis eter  $\pm 0,67$  ml/hewan coba selama 1 menit.

Setelah hewan coba teranastesi dan dalam keadaan pingsan , hewan coba dipindahkan ndi meja lilin lalu dilakukan dislokasi leher untuk memastikan hewan coba benar-benar mati. Lalu keempat kaki hewan coba difiksasi dengan jarum pentul. Dengan menggunakan gunting bedah, dilakukan pembedahan pada abdomen hingga setinggi leher.

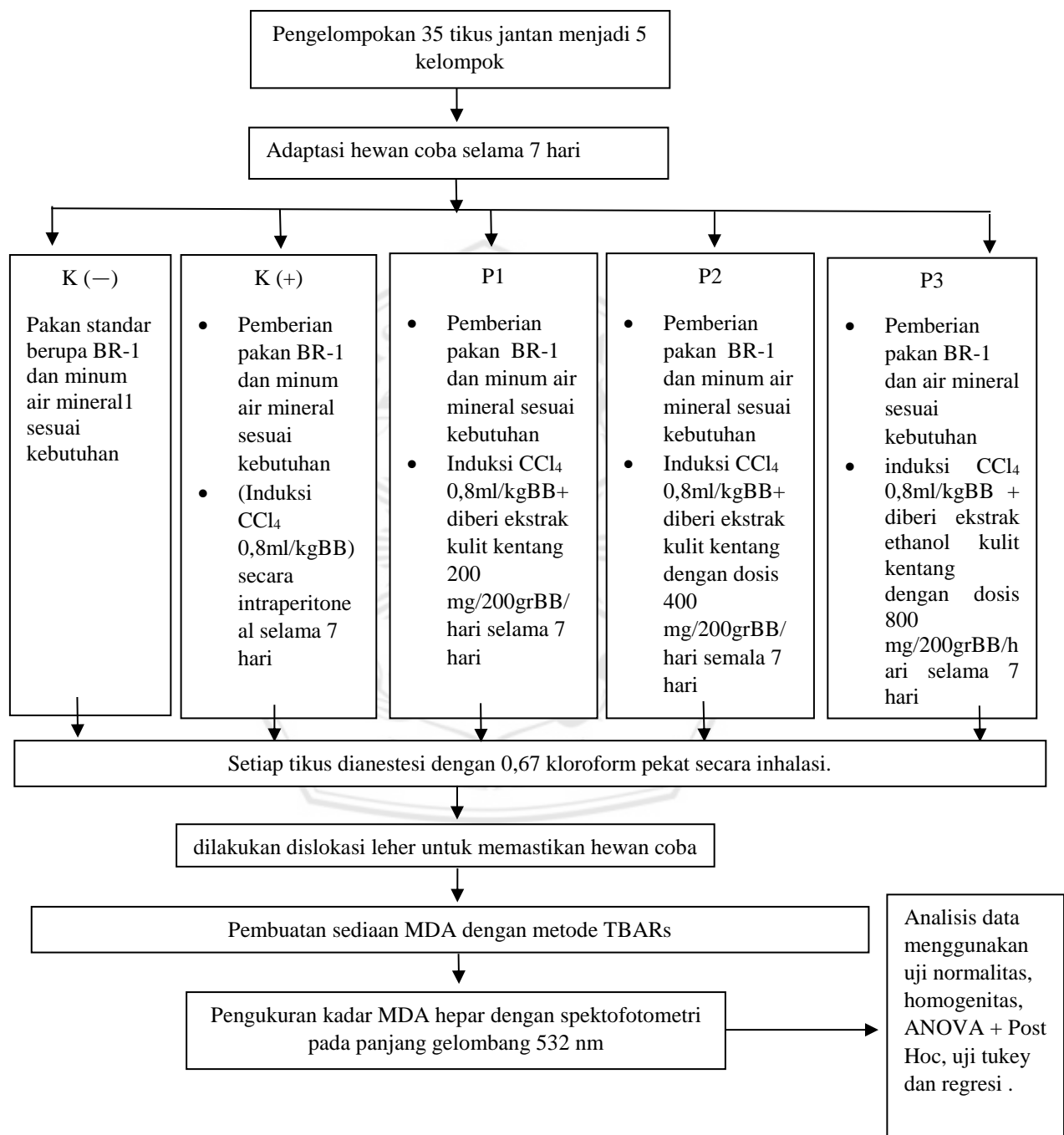
Setelah pembedahan tikus dikubur dengan cara tikus dibungkus dengan

polibag setelah itu dikubur ditanah kering dengan kedalaman 1 meter dan jarak minimal 250 dari sumber air dan setiap lubang tidak lebih dari 10 ekor tikus

#### 4.7.5 Pembuatan Sediaan

- a. Pemeriksaan kadar MDA hati Dikerjakan dengan metode *Thiobarbituric acid reactive substance* (TBARs).. Prinsip metode ini berdasarkan kepada kemampuan pembentukan kompleks berwarna merah muda antara MDA dan Asam Tiobarbiturat (TBA) (Capeyron *et al*, 2002).
- b. Satu gram jaringan hati dihomogenisasi dengan 9,0 ml larutan KCl 1,15% dengan alat *Teflon Potter-Elvehjem homogenizer*. Sebanyak 0,5 ml dari homogenat hati, ditambah dengan 0,5 ml pereaksi TCA 20%.
- c. Selanjutnya larutan homogenate hati yang telah tercampur dengan pereaksi TCA 20% disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. 1 ml larutan dipisahkan dan dicampur dengan larutan TBA 0,67%.
- d. Larutan dipanaskan dalam penangas air (100° C) selama 10 menit. Kemudian larutan didinginkan pada suhu kamar.
- e. Warna yang terbentuk diukur serapannya pada panjang gelombang 530 nm. Kadar MDA dihitung menggunakan kurva standar yang dibuat dengan mereaksikan TEP dalam berbagai konsentrasi dengan TBA 0,67%.
- f. Untuk mengetahui kadar MDA, terlebih dahulu dibuat kurva standar TEP. Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan, diperoleh persamaan garis:  $Y = 0,00032 + 0,0371X$ , dengan Y = blanko larutan TCA 20% dan X= kadar MDA.

#### 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. 1 Alur Penelitian

#### 4.9 Analisis Data

Data-data yang diperoleh dalam penelitian ini akan di analisa menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, uji ANOVA, dan uji regresi linier yang pengolahannya menggunakan SPSS 20.

- a. Uji normalitas data dengan menggunakan tes Saphiro Wilk karena sampel kurang dari 50 (normal  $p > 0,05$ ) dan uji homogenitas data dengan menggunakan tes Levene untuk mengetahui kehomogenan varian dari data-data yang diperoleh. Jika tidak normal maka dtransformasi menggunakan Ln, Log,  $x^2$ ,  $x^3$ ,  $\sqrt{x}$ , dan lain-lain, kemudian dilanjutkan dengan uji normalitas.
- b. Uji ANOVA digunakan untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna antara kontrol dengan perlakuan. Hasil uji ANOVA dikatakan ada perbedaan yang bermakna jika signifikansi (sig)  $< 0,05$ . Apabila data masih tidak normal setelah dilakukan transformasi, maka uji ANOVA diganti dengan Kruskal Wallis.
- c. Uji Post Hoc Bonferroni merupakan uji kelanjutan dari uji ANOVA, digunakan untuk mengetahui kelompok dosis yang mana yg paling bermakna terhadap penurunan kadar MDA jika variansi datanya sama dan apabila berbeda maka menggunakan tukey . Jika distribusi normal dan varian beda maka digunakan uji *Post Hoc Games-Howell*. Namun, apabila ujia ANOVA diganti dengan uji Kruskal Wallis maka uji Post Hoc Bonferroni diganti dengan uji Post Hoc Mann Whithney.
- d. Uji Regresi Linier digunakan untuk mengetahui seberapa kuat hubungan yang didapat dari analisa korelasi dan untuk mengetahui seberapa kuat pengaruh antara dosis ekstrak kulit kentang dengan kadar MDA.